

## **ANTITUMOR EXTRACT AND CHLOROPHYLL DERIVATIVES SEPARATED FROM ACTINIDIA ARGUTA**

Publication number: KR2001-0096881

Publication date: 2001-11-08

Inventor: KIM YOUNG HO (KR); PARK YUN HUI (KR); CHUN EUN MI (KR); BAE MYEONG AE (KR); SEO YEONG BAE (KR); SONG GYEONG SIK (KR)

Applicant: KIM YOUNG HO (KR)

Classification:

-International: A61K35/78

Application number: KR2000-0019854 (2000-04-15)

Abstract:

The present invention is related to the antitumor extract and chlorophyll derivatives separated from *Actinidia arguta*. The extract separated from *Actinidia arguta* and the chlorophyll derivative (Cp-D) isolated therefrom have excellent antitumor activity through inducing apoptosis by reducing the kinase activity of cdks in human leukemia jurkat T cells, HL-60 cells and U937 cells.

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
A61K 35/78

(11) 공개번호 특2001-0096881  
(43) 공개일자 2001년11월08일

(21) 출원번호 10-2000-0019854  
(22) 출원일자 2000년04월15일

(71) 출원인 김영호  
대구 북구 복현2동 복현주공1단지아파트 104동 401호

(72) 발명자 김영호  
대구 북구 복현2동 복현주공1단지아파트 104동 401호  
박윤희  
대구광역시수성구상동314-9번지  
천은미  
대구광역시수성구신매동시지동서타운257동1207호  
배명애  
대구광역시북구구암동655-4번지서한아파트102동103호  
서영배  
대구광역시수성구두산동상풍아파트4동433호  
송경식  
대구광역시수성구신매동천마타운229동1106호

(74) 대리인 이덕록

심사청구 : 없음

(54) 액티니디아 아르쿠타로부터 분리한 항종양성 추출물 및엽록소 유도체

요약

본 발명은 액티니디아 아르쿠타(Actinidia arguta)로부터 분리한 항종양성 추출물 및 엽록소 유도체에 관한 것으로 액티니디아 아르쿠타로부터 분리한 추출물과 이로부터 분리정제한 엽록소 유도체(chlorophyll derivative;Cp-D)는 인간 백혈병 저켓 T 세포, HL-60 세포 및 U937 세포내에서 cdk의 키나아제 활성을 감소시켜 세포자살을 유도함으로써 항종양 활성을 나타내는 뛰어난 효과가 있다.

대표도  
도 4

색인어  
액티니디아 아르쿠타, 추출물, 엽록소 유도체, 항종양성, 백혈병, 세포자살

## 명세서

### 도면의 간단한 설명

도 1a는 본 발명 액티니디아 아르쿠타 추출물을 실리카겔 크로마토그래피, TLC 상에 전개 및 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제하면서 각 정제단계에서 얻어진 분획의 세포독성을 측정한 결과를 나타낸다.

도 1b는 본 발명 액티니디아 아르쿠타 추출물을 실리카겔 크로마토그래피, TLC 상에 전개 및 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피로 정제한 최종 세포독성 물질 분획인 엽록소 유도체(Chlorophyll derivative: Cp-D)의 단일 스팟을 T LC에서 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 본 발명 액티니디아 아르쿠타 추출물을 분리정제하여 얻은 Cp-D의 UV 스펙트럼 측정 결과를 나타낸다.

도 3은 본 발명 액티니디아 아르쿠타 추출물을 분리정제하여 얻은 Cp-D의  $^1\text{H-NMR}$ (A)과  $^{13}\text{C-NMR}$ (B) 스펙트럼 분석 결과를 나타낸다.

도 4는 본 발명 액티니디아 아르쿠타 추출물을 분리정제하여 얻은 Cp-D를 인간 백혈병 저켓 T 세포에 처리한 후 세포 내 DNA에 삽입되는 [ $^3\text{H}$ ]티미딘의 양을 시간경과에 따라 측정한 결과를 나타낸다.

도 5는 본 발명 액티니디아 아르쿠타 추출물을 분리정제하여 얻은 Cp-D를 인간 백혈병 저켓 T 세포에 처리한 후 세포 주기 변화를 플로우사이토메트릭 분석으로 조사한 결과를 나타낸다.

도 6은 본 발명 액티니디아 아르쿠타 추출물을 분리정제하여 얻은 Cp-D를 인간 백혈병 저켓 T 세포에 처리한 후 발생한 세포자살적 DNA 단편화를 아가로스 겔 전기영동상에서 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 본 발명 액티니디아 아르쿠타 추출물을 분리정제하여 얻은 Cp-D를 인간 백혈병 저켓 T 세포에 처리한 후 세포 내 cdk4(A), cdk6(B), cdk2(C), cdc2(D), p27<sup>kip1</sup> (E) 단백질양의 시간에 따른 변화를 웨스턴 블랏으로 확인한 결과 사진도이다.

도 8은 본 발명 액티니디아 아르쿠타 추출물을 분리정제하여 얻은 Cp-D를 인간 백혈병 저켓 T 세포에 처리한 후 세포 내 cdk4(A), cdk6(B), cdk2(C), cdc2(D) 각각의 키나아제활성을 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 액티니디아 아르쿠타(*Actinidia arguta*)로부터 분리한 항종양성 추출물 및 엽록소 유도체(chlorophyll derivative: Cp-D)에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 인간 백혈병 세포인 저켓 T 세포(Jurket T cell)와 U937 세포에서 세포자살을 유도하여 항종양 활성을 나타내는 액티니디아 아르쿠타로부터 유기용매로 추출 분리한 항종양성 추출물 및 상기 항종양성 추출물로부터 크로마토그래피 방법을 이용해 분리정제한 항종양성 엽록소 유도체에 관한 것이다.

지금까지, 항종양 약제를 이용한 화학적 암 치료법으로 유효한 방법이 제공되어져 왔지만 대부분의 항종양 약제는 지금까지 정상 세포와 정상 조직에 독성을 나타내므로 종양세포에 대한 선택성이 제한적이고, 실제로 이들의 항종양 약제로써의 용도는 임상실험동안 관찰된 다양한 부작용에 의하여 몇몇 경우에 제한적으로 사용되어 왔다. 종양에 대한 화학치료의 유효성을 향상시키고 상기 제한적인 문제를 해결하기 위해 종양세포에 대해서만 특정 독성이 있는 새로운 항종양 약제를 분리하고 화학적 치료법에 있어서 암의 파괴를 유도할 수 있는, 종양내 새로운 목표물을 동정하는 것이 요구되

고 있다.

종양내에서 세포자살의 유도메카니즘은 항종양 약제의 작용에 있어서 유효한 목표가 된다. 왜냐면, 악성종양은 세포자살이 유도되어 그들 자체가 파괴됨으로써 제거될 수 있기 때문이다(Bae, M. A. et al. 1998a. Biochem. Biophys. Res. Commun. 246:276 ~ 281, Bae, M. A. et al. 1998b. J. Microbiol. Biotechnol. 8:455 ~ 460, Shi, L. et al. 1994. Science 263:1143 ~ 1145, Watabe, M. et al. J. Biol. Chem. 271:14067 ~ 14080). 세포자살은 세포 죽음의 한 형태이며 세포 수축, 막 수포, 크로마틴 응축 및 뉴클레오솜사이의 DNA 절단에 의한 DNA 단편화등과 같은 형태적 특징을 수반 한다(Williams, G. T. 1991. Cell 65: 1097 ~ 1098). 종양세포에 있어서 화학적 치료제의 세포독성 효과를 매개할수 있는 세포자살의 역할은 상당한 주목을 받아 연구의 초점이 되어왔다. 그 결과, 에토포사이드 (etoposide), VM26, m-AMSA, 덱사메타손(dexamethasone), 빈크리스틴 (vincristine), cis-플라티움(cis-platinum), 사이클로포스파미드 (cyclophosphamide), 파클리탁셀(paclitaxel), 5-플루오로데오시우리딘(5-fluorodeoxyuridine), 5'-플루오로우라실(5'-fluorouracil) 및 아드리아마이신 (adriamycin)과 같은 몇몇 항암제는 종양세포내에서 빠르게 강력한 세포자살을 유도한다고 알려졌다. 그러나 약제에 의해 유도되는 세포자살의 진행과정에 대한 생화학적 기작은 알려진바가 매우 적다.

최근, 본 발명자는 세포자살 유도를 통해 종양에 대해 특정한 독성이 있는 항종양 제제를 분리하고자 연구하였다. 이전에, 본 발명자들은 해양 스트렙토마이세스 속 SCRC A-20으로부터 다양한 악성 종양 세포에 대해 세포독성을 나타내며 종양세포에 대한 그 작용기작으로는 파스 리간드(Fas ligand) 발현을 증가시키고 죽음을 통해 파스 죽음 신호(Fas death signal)를 활성화시켜 세포자살을 유도하는 아부라투보락탐 C(aburatubolactam C)를 분리한 바 있다. 아부라투보락탐 C의 세포독성은 고형암이나 정상 섬유아세포에 비해 백혈병 및 임파종에 좀 더 효과적이다. 가장 최근에, 본 발명자들은 다양한 식용식물로부터 정상세포 또는 조직에는 별 독성을 미치지 않으며 종양세포에 대해 특이적으로 독성을 나타내는 세포독성 물질을 분리하고자 실험을 실시한 결과, 식용식물 액티니디아 아르쿠타(Actinidia arguta)로부터 세포자살을 유도하여 항종양 활성을 나타내는 세포독성 물질을 분리하였고 이를 정제한 후 기기분석하여 엽록소 유도체(Chlorophyll derivative; Cp-D)를 얻었다. 상기 Cp-D는 다양한 종양 세포에 대해 세포독성을 나타냈고 저켓 T 세포내에서 세포자살을 유도하였다. 이때, 본 발명자는 저켓 T 세포내에서 유도된 세포자살 메카니즘으로서 처리된 약제에 의해 저켓 T 세포내 사이클린 의존 키나아제(cdk)의 키나아제활성이 세포주기의 진행에 부적절하게 조절되어지며 이를 통해 세포자살이 유도되어 세포가 죽음에 이르게 됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 액티니디아 아르쿠타(Actinidia arguta)로부터 유기용매를 사용하여 추출 분리한 항종양성 추출물을 제공함에 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 항종양성 추출물로부터 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리정제한 항종양성 엽록소 유도체를 제공함에 있다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 상기 목적은 한국산 식용식물 50종으로부터 추출물을 얻은 후 이들 중 저켓 T 세포와 U937 세포에 대해 가장 높은 세포독성을 나타내는 액티니디아 아르쿠타(Actinidia arguta) 추출물을 저압농축하고 고순도로 정제한 후 구조분석하여 추출물내 세포독성을 나타내는 물질이 엽록소 유도체(Chlorophyll derivative; Cp-D)임을 확인하고 상기 Cp-D의 세포독성과 세포자살 유도를 MTT assay와 아스로스 전기영동에 의한 세포자살 DNA 단편 분석으로 확인하였다. 이어서, 플로우 사이토메트리 분석, 웨스턴 블랏팅 및 면역침전에 의해 상기 Cp-D가 세포독성 활성을 나타내는 메카니즘을 조사함으로써 달성하였다.

이하, 본 발명의 구성을 설명한다.

#### 발명의 구성 및 작용

본 발명은 한국산 식용식물 50종을 클로로포름( $\text{CHCl}_3$ )과 메탄올( $\text{MeOH}$ )로 구성된 용액으로 추출하고 상기 추출물들의 저켓 T 세포와 U937 세포에 대한 세포독성을 MTT assay로 분석하여 가장 높은 세포독성을 나타낸 액티니디아 아르쿠타 (*Actinidia arguta*) 추출물을 분리하는 단계; 상기 저켓 T 세포와 U937 세포에 세포독성을 나타낸 액티니디아 아르쿠타 추출물을 저압농축한 후 실리카겔 컬럼 크로마토그래피, TLC 플레이트 상에 전개, 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 정제하고 각각의 정제단계에서  $\text{IC}_{50}$  값을 측정하여 정제하면서 점차적으로 세포독성 활성이 증가함을 확인하는 단계; 액티니디아 아르쿠타로부터 추출하여 정제한 세포독성 활성물질의 자외선 스펙트럼,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼을 조사하여 구조를 분석한 결과 상기 정제된 세포독성 활성물질이 엽록소 유도체 (Chlorophyll derivative; Cp-D)임을 확인하는 단계; 플로우사이토메트리 분석(Flow cytometry analysis)에 의해 Cp-D 처리한 저켓 T 세포와 세포주기의 특정 단계에서 세포축적을 발생시키지 않음을 확인하는 단계; 웨스턴 블랏으로 Cp-D를 처리한 저켓 T 세포의 세포주기의 진행을 조절하는 cdk's 및 cdk's의 활성 저해 단백질인 p27<sup>Kip1</sup>의 양적 변화를 분석하는 단계; 면역침전 및 키나아제 활성분석에 의해 cdk's의 키나아제 활성에 미치는 Cp-D의 영향을 분석하는 단계로 구성된다.

본 발명에서 액티니디아 아르쿠타 추출물과 이로부터 분리한 엽록소 유도체는 그 자체로 항종양 약제로 이용할 수 있지만 통상의 부형제와 혼합하여 캡슐, 환제 등으로 제조하여 약제로 이용할 수 있으며 환자의 나이, 체중, 병의 중증도 등에 따라 투여량을 달리할 수 있다.

본 발명에서 사용한 단백질 G-아گار로스 및 E64는 칼바리오캠(san Diego, U.S.A)로부터 구입하였으며  $\alpha$ -카제인, 트윈-20,  $\beta$ -글리세로포스페이트, p-니트로페닐 포스페이트, 소듐 오르토반나데이트, RNase, 프로테이나아제 K 및 프로피디옴 요오드는 Sigma(St. Louis, U.S.A)로부터 구입하였다. [ $^3\text{H}$ ] 티미딘(2Ci/mM) 방사선허성 물질은 NE N Biotechnology 시스템(Boston, MA, U.S.A)에서 [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP(3,000Ci/mM)는 Amersham(Arlington Heights, U.S.A)로부터 구입하였다. 실리카겔(Merck Kieselgel 60, 70 ~ 230 메쉬)과 실리카 TLC 플레이트(실리카겔 60 F<sub>254</sub>)는 Merck Company(Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 토끼 다클론 항-cdk4, 항-cdk6, 항-cdk2 및 항-cdc2 항체들은 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, U.S.A)에서, 단일클론 항-FasL 및 항-Fas 항체는 형질전환 실험실(Lexington, U.S.A)에서 구입하였다. 인간 백혈병 저켓 T 세포와 골수성 백혈병 U937 세포는 Dr. Albert A. Nordin(Gerontology Research Center, NIA/NIH, Baltimore, U.S.A)에게 제공받았다. 인간 전골수 백혈병 세포 HL-60 세포, 인간 대장 아테노카시노마(adenocarcinoma) COLO 320DM 세포 및 쥐 섬유아세포 NIH 3T3 세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 제공받았다. 저켓 T 세포, U937 세포, HL-60 세포 및 COLO 320DM 세포는 10% FBS(UBI, Lake Placid, U.S.A), 20mM HEPES(pH 7.0),  $5 \times 10^{-5}\text{M}$   $\beta$ -MeOH 및 100  $\mu\text{g/mL}$  젠타마이신을 함유하는 RPMI 1640(Life Technologies, Gaithersburg, U.S.A)내에서 보존하였다.

본 발명에서 NIH 3T3세포와 사코마 180(sarcoma 180)을 위해 사용한 배양 배지는 10% FBS, 20mM HEPES(pH 7.0), 1mM 소듐 피루베이트,  $5 \times 10^{-5}\text{M}$   $\beta$ -MeOH 및 100  $\mu\text{g/mL}$  젠타마이신을 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Life Technologies, Gaithersburg, U.S.A)였다.

#### 실시예 1: 항종양 활성이 있는 식용식물의 분리

한국산 식용식물 약 50종을 수집하여 상온에서 건조시켰다. 이들 식용식물내에 항종양 활성을 나타내는 효과적인 성분의 검출하기 위해 각각의 식물 10g을 클로로포름( $\text{CHCl}_3$ )과 메탄올( $\text{MeOH}$ )로 구성된 용액(클로로포름:메탄올=2:1, v/v) 10mL로 추출하고 저압하에서 증발시켰다. 잔여물을 DMSO내에 용해시키고 저켓 T 세포와 U937 세포에 대한 세포독성을 MTT 분석에 의해 분석하였다. 실험결과, 액티니디아 아르쿠타의 추출물이 인간 백혈병 저켓 T 세포와 U937 세포에 가장 높은 세포독성을 나타냈다.

#### 실시예 2: 액티니디아 아르쿠타 추출물로부터 세포독성 활성물질 정제

본 실시예에서는 상기 실시예 1에서 얻은 저켓 T세포와 U937 세포에 세포독성을 나타내는 액티니디아 아르쿠타를 공기건조한 후 약 1kg을 클로로포름과 메탄올 혼합물(2:1, v/v) 10L로 상온에서 계속 교반하면서 6시간동안 추출하였다. 추출물을 저압 농축하여 분말 20g을 얻었다. 저켓 T 세포와 U937 세포 모두에 대해 액티니디아 아르쿠타 조추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 100 $\mu$ g/mL(도 1a)이었다. 조추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 적용하고 이를 클로로포름과 메탄올로 단계적으로 용출하였다. 클로로포름과 메탄올(8:2, v/v)로 용출한 활성 분획을 건조시키기 위해 증발시켰다. 증발 후 저켓 T 세포와 U937 세포에 세포독성을 나타내는 분말(4g)의 IC<sub>50</sub> 값은 80 ~ 85 $\mu$ g/mL이었다(도 1a). 상기 분말을 TLC 플레이트(클로로포름 : 메탄올=9:1, v/v)상에 전개된 후, R<sub>f</sub> 0.45에 상응하는 밴드는 회수하여 클로로포름과 메탄올(2:1, v/v) 혼합물로 추출하고 증발 농축하였다. 회수한 정제 추출물은 400mg이며 IC<sub>50</sub>은 20 ~ 22 $\mu$ g/mL을 나타냈다(도 1a). 상기 TLC 정제 추출물을 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피(클로로포름:메탄올=1:2, v/v)하여 저켓 T 세포와 U937 세포에 대해 IC<sub>50</sub> 값이 10 ~ 15 $\mu$ g/mL 인 세포독성 화합물 50mg를 회수하였다(도 1a). 결과적으로 세포독성 화합물의 특정 활성이 정제 과정에서 7 ~ 10배 증가하였다. 상기 최종 얻어진 세포독성 화합물의 순도를 확인하기 위해, 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피하고 TLC(실리카겔 60 F<sub>254</sub>, 클로로포름:메탄올=9:1, v/v) 분석을 실시하였다. 정제된 물질은 0.45 R<sub>f</sub> 값의 단일 스팟을 나타냈다(도 1b).

### 실시예 3: 정제된 세포독성 활성물질의 구조분석

상기 실시예 2에서 순수하게 정제된 최종 세포독성 물질의 구조를 밝히기 위해 자외선(ultraviolet:UV)스펙트럼 분석은 UV 스펙트로포토미터(Shimadzu, Japan)을 이용하여 실시하였다. 즉, 정제된 세포독성 물질 1 $\mu$ g을 메탄올 1mL에 용해하고 200 ~ 800nm에서 UV 스펙트럼을 측정하였다. <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼은 클로로포름-d 용매에 용해시킨 샘플 10mg을 사용하여 GSX-400 스펙트로미터(JEOL, Japan)로 측정하였다. 실험결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 순수하게 정제된 세포독성 물질은 410과 665nm에서 엽록소의 전형적인 UV 흡광을 나타냈다. 도 3의 (A)에 나타낸 바와 같이 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼의 경우,  $\delta$  7 ~ 10ppm에서의 아로마틱 싱글렛 공명(aromatic singlet resonance s)을 통해 포르피린환 골격이 존재함을 나타내고  $\delta$  1.25ppm 근처에서 겹쳐진 메틸렌 신호(methylene signals)는 피톨 결사슬이 시료물질내에 존재함을 나타냈다. 도 3의 (B)에 나타낸 바와 같이 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서는, 4차  $\alpha$ - 및  $\beta$ -피톨 탄소의 신호를 포함하는 아로마틱-올레핀 지역의 중앙 부분은 매크로실(macrocyle)에서 구조적 변경에 대해 가장 높은 감도를 나타낸다. 이들 신호는 엽록소 페오피틴(pheophytin)  $\alpha$ 의 데이터와 거의 일치하는 것이지만  $\delta$  177ppm 근처의 신호와 sp<sup>3</sup> 하이브리드 또는 10 ~ 75ppm 범위의 값인 지방족 탄화수소(aliphatic) 지역은 페오피틴  $\alpha$ 와 일치하지 않았고, 세포독성 화합물은 피톨 결사슬에 있어서 차이가 있음을 나타냈다. 결과적으로, 액티니디아 아르쿠타 추출물로부터 순수 분리정제된 세포독성 화합물은 엽록소 유도체(chlorophyll derivative; Cp-D)로 동정되었으며 좀더 구체적으로 구별되는 지방족 탄화수소(aliphatic) 알콜 결사슬을 갖는 페오피틴  $\alpha$ 임을 확인하였다.

### 실시예 4: Cp-D의 세포독성 활성과 세포자살 유도

본 실시예에서는 여러 종양세포에 대해 순수분리 정제된 Cp-D의 세포독성 효과를 MTT assay 또는 [ $^3\text{H}$ ]티미딘 결합법에 의해 분석하였다. MTT assay의 경우, 종양세포( $5 \times 10^4$ )를 96-웰 플레이트내 Cp-D의 순차적인 희석물과 함께 2일 동안 성장시켰으며, 배양 후 MTT 용액  $50\mu\text{L}$ 를 각 웰에 첨가한 후 4시간 추가적으로 배양하였다. MTT로부터 생성된 포마잔 크리스탈의 양은 DMSO  $150\mu\text{L}$ 내에 용해시켜 플레이트 판독기로  $540\text{nm}$ 에서 측정하였다. Cp-D로 처리된 저켓 T 세포의 DNA내로 [ $^3\text{H}$ ] 티미딘의 삽입은 96-웰 플레이트내에서 Cp-D  $15\mu\text{g/mL}$ 과 함께 세포  $5 \times 10^4$ 를 첨가하여 시간별로 결정하였다. 배양 후 [ $^3\text{H}$ ] 티미딘  $1\mu\text{Ci/well}$ 을 4시간 동안 첨가하였고 액체 섬광대에 의해 [ $^3\text{H}$ ] 티미딘의 삽입을 분석하였다. 또 세포자살 DNA 단편화를 확인하기 위해서는 Cp-D 처리된 세포를 원심분리하여 수확한 후 라이시스 버퍼(1% NP-40, 20mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 7.5)로 처리하였다. 이를 5분동안  $1,600 \times g$ 에서 원심분리하고 상청액을 수집하여 SDS의 농도가 1%되게 첨가한 후  $50^\circ\text{C}$ 에서 2시간동안 RNase A로 처리하였으며 이어서  $37^\circ\text{C}$ 에서 2시간 동안 프로테이나제 K로 처리하였다. DNA단편을 5M 암모늄 아세테이트 존재하에 에탄올 2.5 부피로 침전시켜 회수하였고, 회수된 DNA 단편을 2% 아가로스 겔상에서 전기영동하여 육안으로 확인하였다. 실험결과, Cp-D의  $\text{IC}_{50}$  값은 쥐의 정상 섬유아세포 NIH 3T3에 대해서는  $25\mu\text{g/mL}$ , 쥐의 육종암세포 사코마 180(sarcoma 180)에 대해서는  $\geq 100\mu\text{g/mL}$ , 인체 대장암세포인 COLO 320DM에 대해서는  $70\mu\text{g/mL}$ , 그리고 인체 백혈병세포인 HL-60, U937, 저켓 T 세포들에 대해서는 각각  $11.4\mu\text{g/mL}$ ,  $10\mu\text{g/mL}$ ,  $15\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 결과적으로 Cp-D가 정상 섬유아세포 또는 고형암에 비해 인체백혈병 세포에 대해 보다 강력한 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 또 도 4에 나타난 바와 같이  $15\mu\text{g/mL}$  농도의 Cp-D를 저켓 T 세포에 처리했을 때, 세포성장의 지표가 되는 DNA내로의 [ $^3\text{H}$ ] 티미딘 삽입은 매우 빠르게 억제되어 억제처리 1 시간 이후부터도 검출되지 않았으며 이어서 억제처리 48 시간 이후까지도 전혀 검출되지 않는 것으로 나타났다. 이로부터 Cp-D 처리에 의해 세포내 DNA 합성이 빠르게 저해됨을 확인할 수 있었다. 또 도 5와 도 6에 나타난 바와 같이 Cp-D 처리 후 저켓 T 세포의 세포 주기 분포는, 세포자살 과정에 의해 죽어가는 세포를 지시하는 sub-G1 피크가 플로우 사이토메트리에 의해 확인되고 뿐만 아니라 세포자살적 DNA 단편화가 아가로스 겔 전기영동상에서 검출되는 시기인 36시간까지 별 변화가 나타나지 않았다. 또한 저켓 T 세포를 48 시간동안  $2.5 \sim 15\mu\text{g/mL}$  범위내의 다양한 농도의 Cp-D로 처리했을 때, 아가로스 겔 전기영동 상에서 세포자살적 DNA 단편화는 Cp-D 농도가  $2.5\mu\text{g/mL}$  인 경우에도 검출할 수 있었다. 상기 결과로부터 액티니디아 아르쿠타로부터 추출분리되어 순수 정제된 Cp-D가 세포자살을 유도하여 항종양 효과를 나타내며 또한 종양세포내의 DNA 합성을 빠르고 지속적으로 저해함으로써 세포자살을 이끌어 냄을 확인할 수 있었다.

#### 실시예 5: Cp-D 처리에 의한 세포주기 변화

본 실시예에서는 Cp-D로 처리한 저켓 T 세포의 세포 주기의 변화를 플로우 사이토메트리로 분석하였다.

일반적으로 진핵세포 주기는 전형적으로 4단계로 나뉘어진다. 이들은 DNA 합성 기(S 단계)와 G1, G2로 불리는 차이에 의해 분리되어지는 유사분열기(M 단계)이다. 포유류 세포내 이들 각각의 단계적 진행은 cdk의 순차적인 활성화 및 비활성화에 의해 되어 정교하게 조절된다. G2/M 전환은 활성 cdc2(cdk1/사이클린 B 복합체)가 촉매적으로 조절하고 G1/S 전환은 cdk2/cyclin E 및 cdk2/cyclin A 복합체가 조절을 한다. G1단계의 진행은 주로 D형 사이클린과 복합체를 형성하는 cdk4와 cdk6에 의해 이루어진다. 이러한 세포주기의 진행중 cdk활성의 부적절한 조절이 세포자살을 유도할 수 있음은, 세포주기 진행중 p34<sup>cdc2</sup> 키나아제의 조기활성화가 세포자살 유도 및 직결될 수 있음이 밝혀짐으로써 최초로 제시된 바 있다.

본 실시예에서는 상기 이론에 입각하여 저켓 T 세포에 Cp-D를  $15\mu\text{g/mL}$  농도로 시간별로 처리하면서 이때 유도되는 세포자살적 DNA단편화에 세포주기의 변화가 수반되는지를 분석하였다.

세포주기의 분석은 Cp-D를 처리한 세포를 시간별로 회수하고 세포내 DNA를 프로피디움 요오드화물로 염색한 후 플로우 사이토메트리로 세포내의 DNA함량을 측정함으로써 실시하였다. 먼저 약제에 처리된 약  $1 \times 10^6$  세포를 PBS의  $100\mu\text{L}$ 내 현탁시키고 95% 차가운 에탄올  $200\mu\text{L}$ 로 고정하였으며, 2% FCS를 함유하는 PBS로 2차례 세척한 후 1.12% 구연산 나트륨 버퍼(pH 8.45)  $250\mu\text{L}$ 내에서 RNase  $12.5\mu\text{g}$ 으로 처리하였다. 이어서 상온에서 30분 동안 프로피디움 요오드화물( $50\mu\text{g/mL}$ )  $250\mu\text{L}$ 를 첨가하여 세포내 DNA를 염색하였으며 염색된 세포내 DNA양은 플로우 사이토메터로 분석하였다. 실험결과, Cp-D처리후 유도되는 세포자살 기작에 의해 죽어가는 세포를 나타내는 sub-G1 피크가 최초로 확인되는 36 시간까지도 처리된 저켓 T 세포의 세포주기의 변화는 크게 나타나지 않았으나 G1단계 세포의 7%정도의 증가, S단계 세포의 8%감소 및 G2/M단계 세포의 6%감소 등과 같은 변화가 확인되므로, 이로서 약제 처리후 G1 세포에 비해 S단계와 G2/M단계의 세포들이 세포자살을 일으킴을 확인하였다.

## 실시예 6: 웨스턴 블랏에 의한 cdk5 및 cdk저해단백질 분석

본 실시예에서는 세포주기의 G1/S전환 뿐만아니라 G2/M 전환에 필수적인 cdk5의 촉매활성이 다발적으로 Cp-D에 의해 저해될 것으로 예상하고 이를 증명하기 위해, 15 $\mu$ g/mL의 Cp-D로 저켓 T 세포를 처리한 후 키나아제 활성 뿐만 아니라 cdk5의 단백질량의 변화를 웨스턴 블랏으로 분석하였다.

즉, HB 라이시스 버퍼(137mM NaCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 60mM  $\beta$ -글리세로포스페이트, 15mM p-니트로페닐 포스페이트, 0.1mM 소듐 오르토반나데이트, 1mM DTT, 15mM EGTA, 1mM PMSF, 4 $\mu$ g/mL E64, 0.1% 트리톤 X-100, 25mM MOPS, pH 7.2) 100 $\mu$ L내에서  $4 \times 10^6$  저켓 T 세포를 재현탁시키고 초음파 분해처리하여 파쇄하고 4 $^{\circ}$ C에서 30분동안 추출하여 세포파쇄추출물을 준비하고, 상기 준비된 세포 파쇄추출물의 상당량을 11% SDS-폴리아크릴아마이드 겔상에서 전기영동하였으며 이는 임포빌론-P 막(Millipore Co., Bedford, MA, U.S.A)에서 실시하였다. 상기 막을 상온에서 1 ~ 2 시간 동안 블로킹버퍼(3% 탈지유, 0.1% 트윈-20, 100 $\mu$ g/mL 젠타마이신)로 처리하고 상기 막을 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 토끼 폴리클론 항-cdk4, 항-cdk6, 항-cdk2 또는 항-cdc2 항체로 탐침(probe)시켰다. 이후 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 염소 항-토끼 IgG와 결합된 양고추냉이 퍼옥시다아제로 처리하였다. 각 단백질 검출은 ECL 웨스턴 블랏팅 검출시스템을 이용하여 X-선 필름상에서 육안으로 관찰하였다. 실험결과, 도 7에 나타난 바와 같이 cdk4, cdk6, cdk2 및 cdc2등의 단백질은 웨스턴 블랏 분석에 의해 저켓 T 세포내에서 쉽게 검출되었고 단백질 수준은 약제 처리 후 24시간 까지 유의성 있게 변화하지 않았으나, 그후 부터는 cdk2를 제외하고는 cdk2, cdk6 및 cdc2 모두의 경우 현저하게 감소하였다. 한편 cdk5의 키나아제 활성이 각각 특이적인 cdk저해제에 의해 억제조절될 수 있으며 또한 p27<sup>Kip1</sup> 이 T 세포의 주요 cdk저해제로 알려져 있으므로, p27<sup>Kip1</sup> 의 양적변화도 확인하였다. 예상과는 달리, p27<sup>Kip1</sup> 단백질은 Cp-D 처리후 6 ~ 18시간내에서 오히려 약간 감소하는 경향을 나타내었으며 이후 다시 증가하여 약제처리 이전의 수준으로 회복되었다.

## 실시예 7: 면역침전 및 키나아제 분석에 의한 cdk 저해 단백질 분석

상기 실시예 6과 동일한 방법으로 세포 파쇄추출물을 준비하고 각각의 cdk5의 면역침전에 대해, 1 $\mu$ g/I일 때, 상기 준비한 세포 파쇄물 60 $\mu$ g을 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 각 cdk 항체 2 $\mu$ g과 반응시켰다. 면역 복합체를 단백질 G-아가로스 30 $\mu$ L와 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 혼합한 다음 원심분리(2000  $\times$  g로 3분 동안)하여 회수 하였다. 회수된 단백질 G-아가로스를 라이시스 버퍼로 3차례 세척한 후 키나아제 분석 버퍼(137mM NaCl, 5mM EGTA, 1mM 소듐 오르토바드산 나트륨, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM PMSF, 4 $\mu$ g/mL E64, 25mM MOPS, pH 7.2)로 한차례 세척하였다. 이어서 면역침전물의  $\alpha$ -카제인 키나아제 활성에 대해 분석하였다.  $\alpha$ -카제인의 인산화는 30 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 핫 키나아제 어세이 콕테일(hot kinase assay cocktail)( $\alpha$ -카제인 1mg/mL, 10 $\mu$  Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 100 $\mu$  M ATP, 1 $\times$  키나아제 분석 버퍼) 30 $\mu$ L와 함께 단백질 G-아가로스 비드를 반응하여 측정하였다. 이때 키나아제반응은 5분 동안 1 $\times$  SDS 샘플 버퍼내에서 혼합물을 끓여서 중지시켰으며, 얻어진 반응 혼합물을 11% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동상에서 분리하였다. 겔을 건조시킨 후 인산화된  $\alpha$ -카제인의 존재를 -70 $^{\circ}$ C에 노출시킨 후 오토라이도그래피로 검출하였다. 실험결과, 도 8에 나타난 바와 같이 동일한 조건에서 cdk4, cdk6, cdk2 및 cdc2와 같은 모든 cdk5들의 촉매활성은 Cp-D를 처리함에 따라 빠르게 동시다발적으로 감소하여 1 ~ 6시간내에 최소 수준 또는 검출이 되지않는 수준으로 나타났다. 모든 cdk5의 키나아제 활성이 약제처리 12시간 후에는 초기 수준으로 일제히 회복되었고 이후 24시간까지는 지속되었다. 그러나 동일한 조건하에서 24시간까지는 세포주기분포내에서 유의성 있는 변화가 나타나지 않았으므로, 결과적으로 Cp-D는 세포 주기 진행과는 관계없이 후기-전이 조절기작에 영향을 미쳐서 세포 cdk5의 촉매적 활성을 빠르게 저해함을 알 수 있었다.

## 발명의 효과

이상, 상기 실시예에서 설명한 바와 같이, 액티니디아 아르쿠타로부터 분리한 추출물과 이로부터 분리정제한 엽록소 유도체(chlorophyll derivative; Cp-D)는 인간 백혈병 저켓 T 세포, HL-60세포 및 U937 세포의 cdk 키나아제 활성을 감소시켜 세포자살을 유도함으로써 항종양 활성을 나타내는 뛰어난 효과가 있으므로 본 발명은 생물의약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

## (57) 청구의 범위

청구항 1.

엑티니디아 아르쿠타 건조식물체를 클로로포름과 메탄올 혼합유기용매(2:1, v/v)로 추출하여 수득된 추출물을 저압증발시켜 제조되고 인간 백혈병 세포의 세포자살을 유도하여 항종양 활성을 나타내는 항종양성 엑티니디아 아르쿠타 추출물.

청구항 2.

제 1 항의 항종양성 엑티니디아 아르쿠타 추출물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피로 1차 정제한 후 1차 정제된 물질을 TLC 플레이트상에서 전개시켜 2차 정제한 후 2차 정제된 물질을 세파덱스 LH-20 컬럼크로마토그래피로 3차 정제하는 것을 특징으로 하는 항종양성 엽록소 유도체 제조방법.

청구항 3.

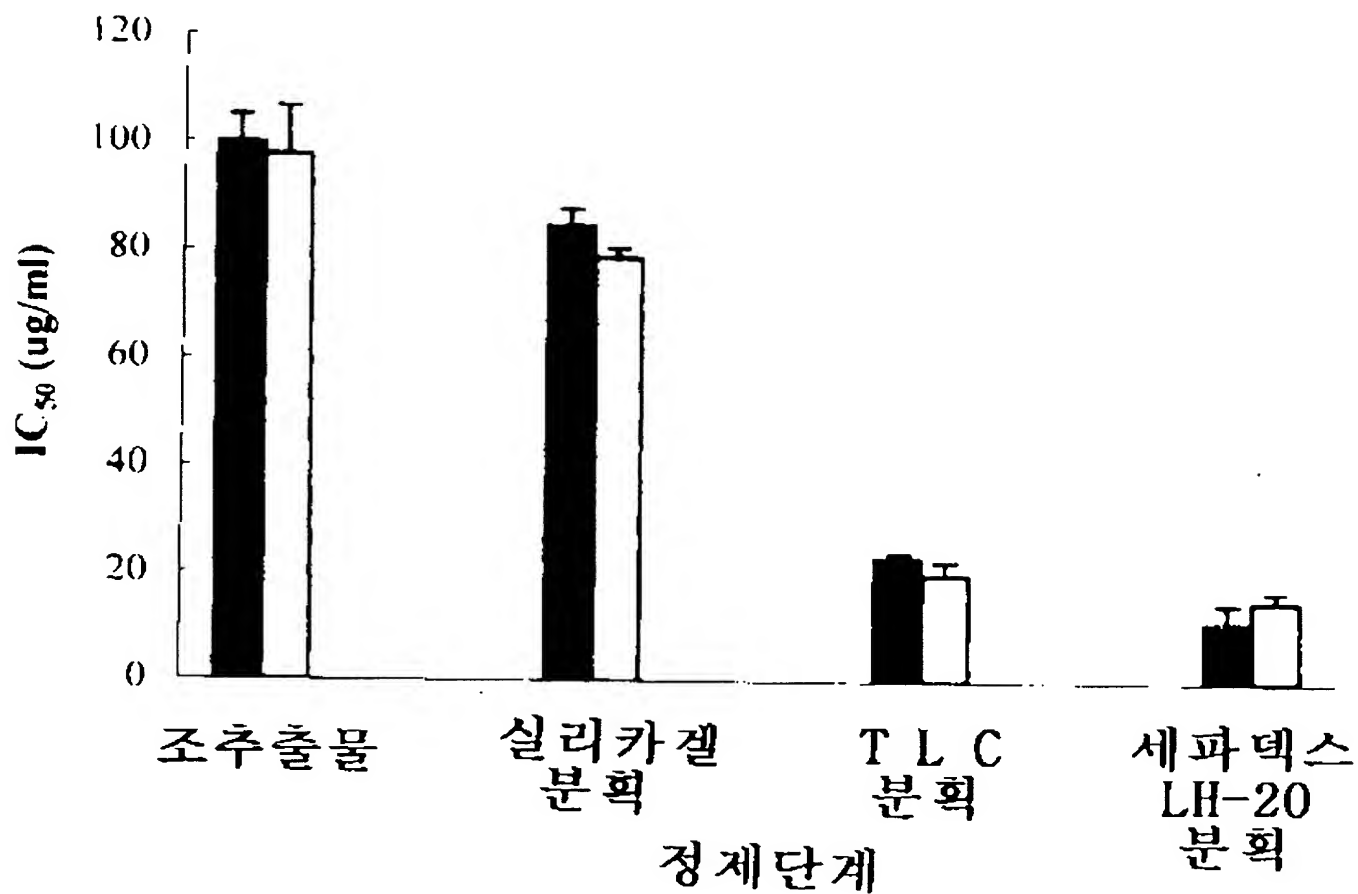
제 2 항의 제조방법에 의해 제조된 항종양성 엽록소 유도체.

청구항 4.

제 1 항의 인간 백혈병 세포의 세포자살을 유도하는 항종양성 엑티니디아 아르쿠타 추출물 또는 제 3 항의 항종양성 엽록소 유도체를 유효성분으로 포함하는 항종양성 조성물.

도면

도면 1a

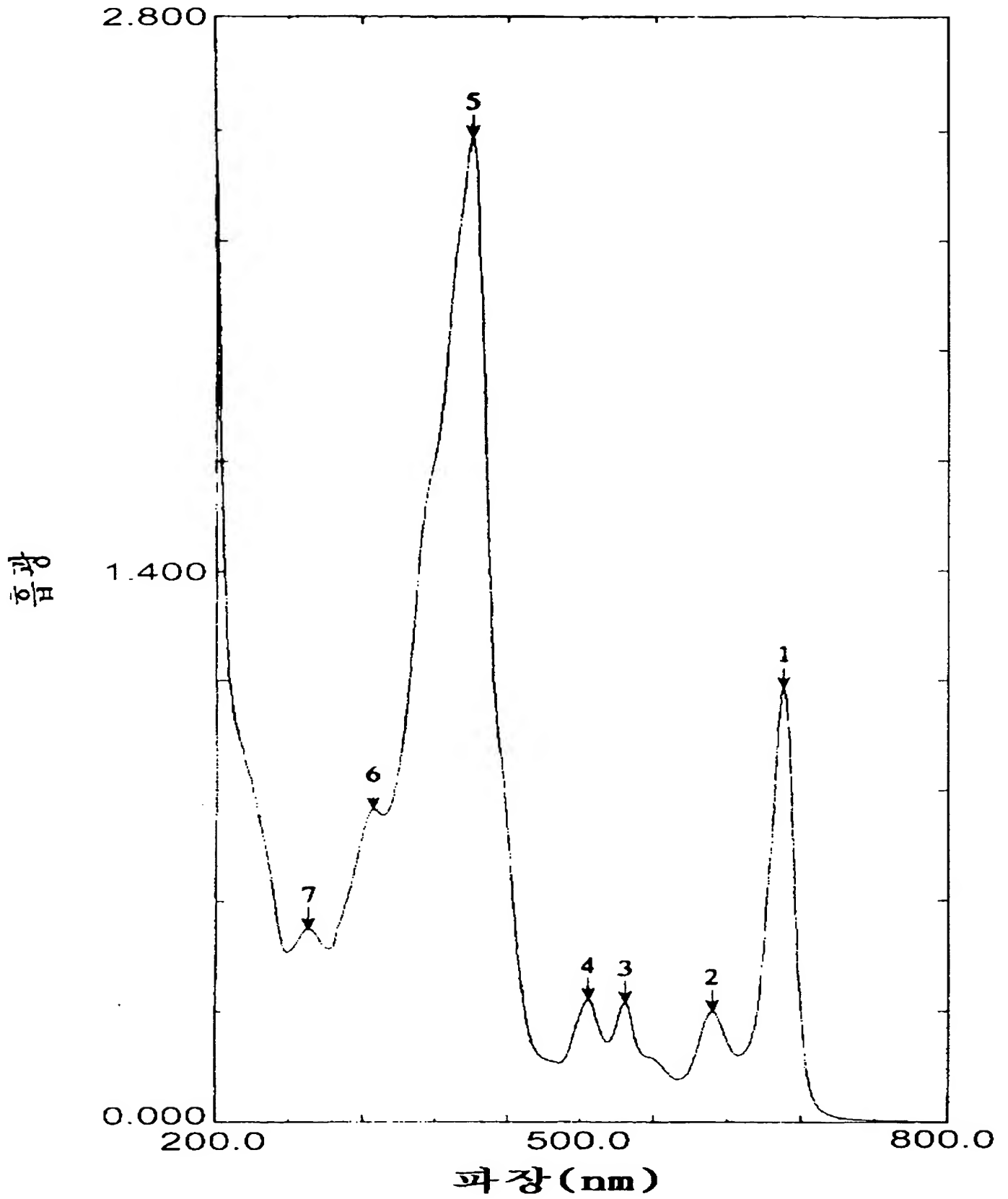


[보기] ■ : U937  
□ : 저켓 T 세포

도면 1b

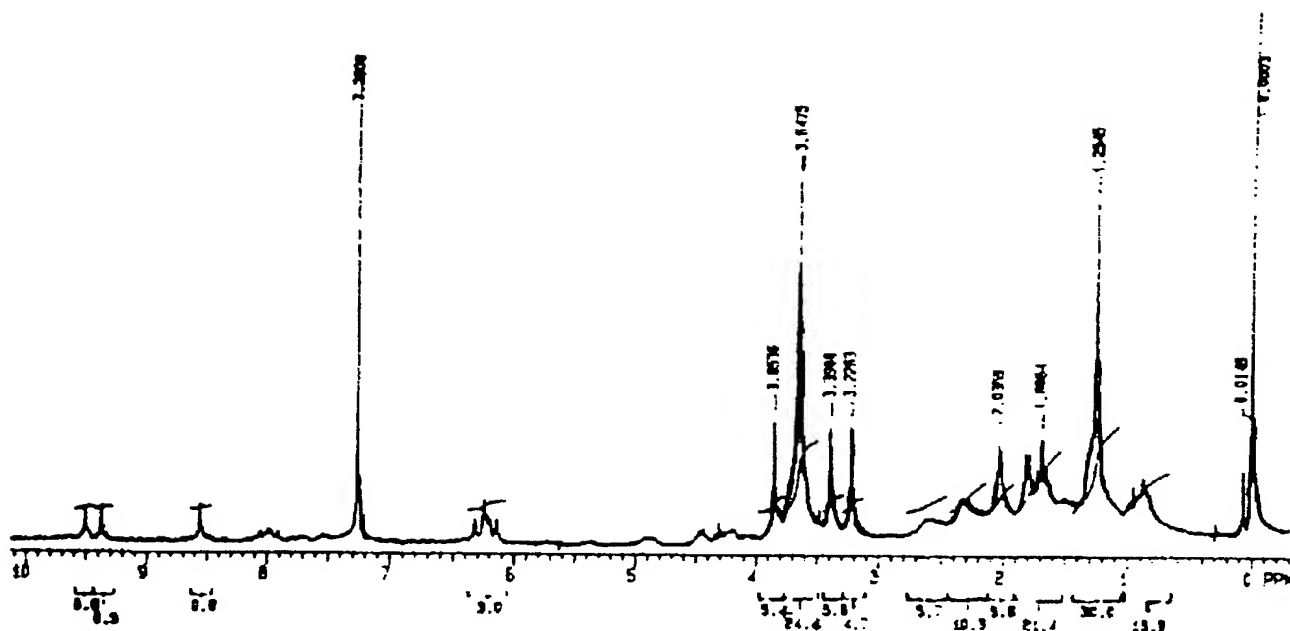


도면 2

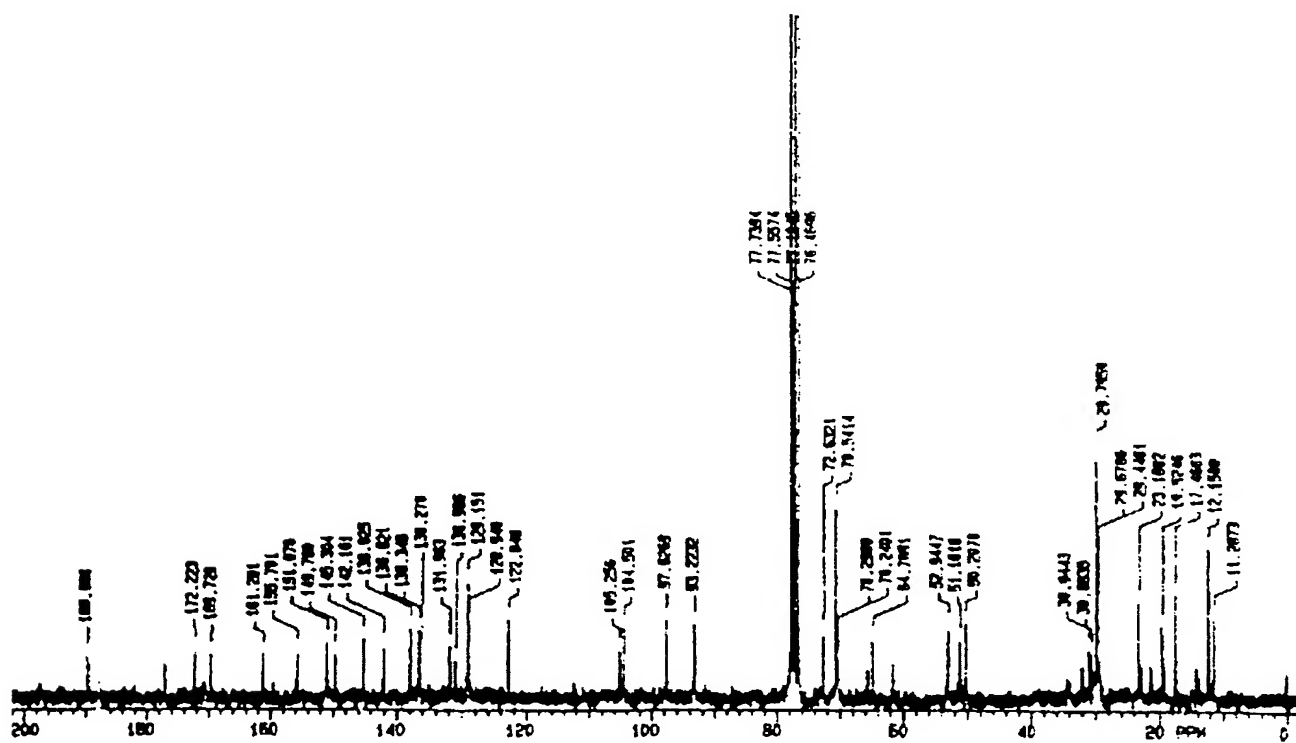


도면 3

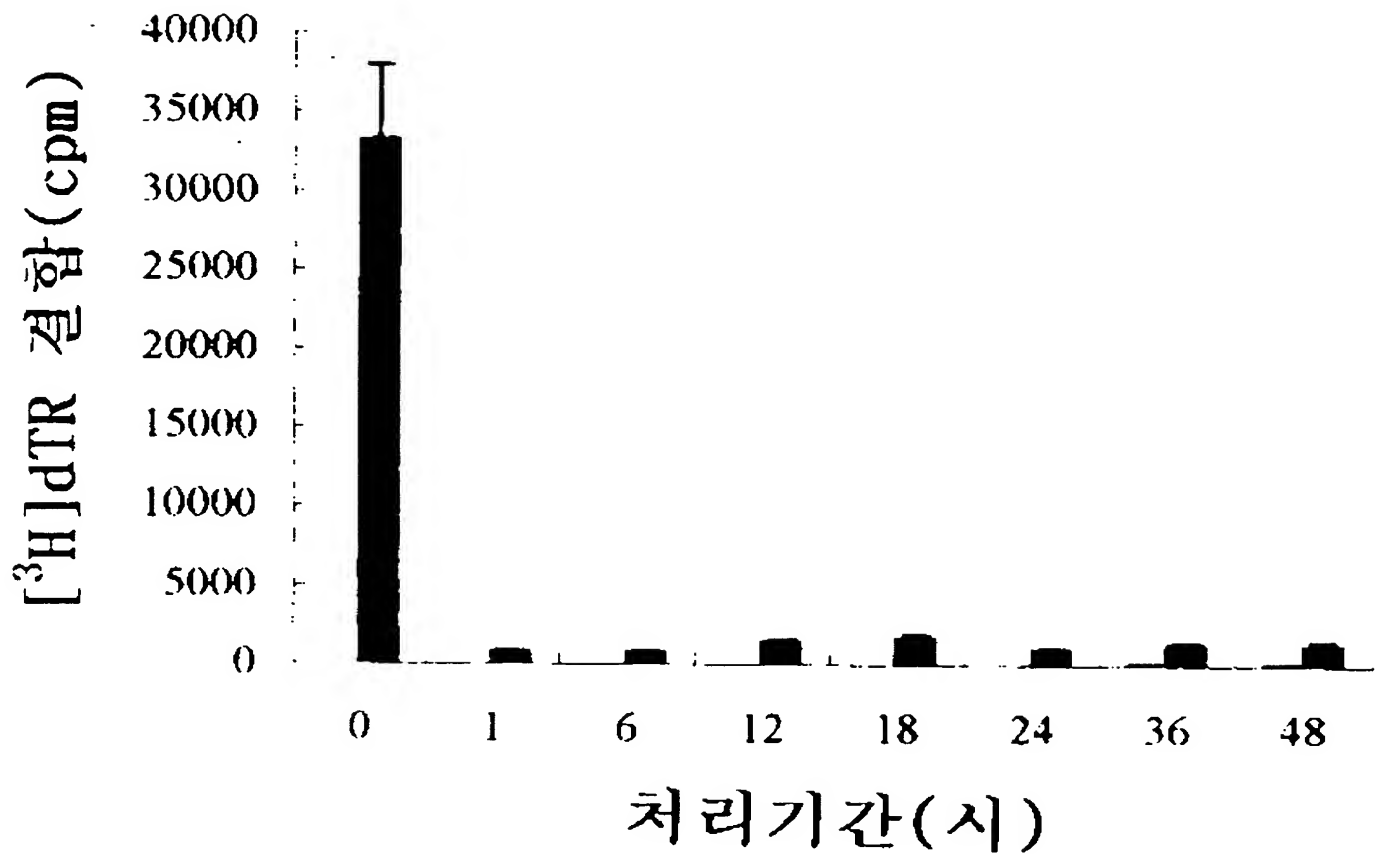
(A)



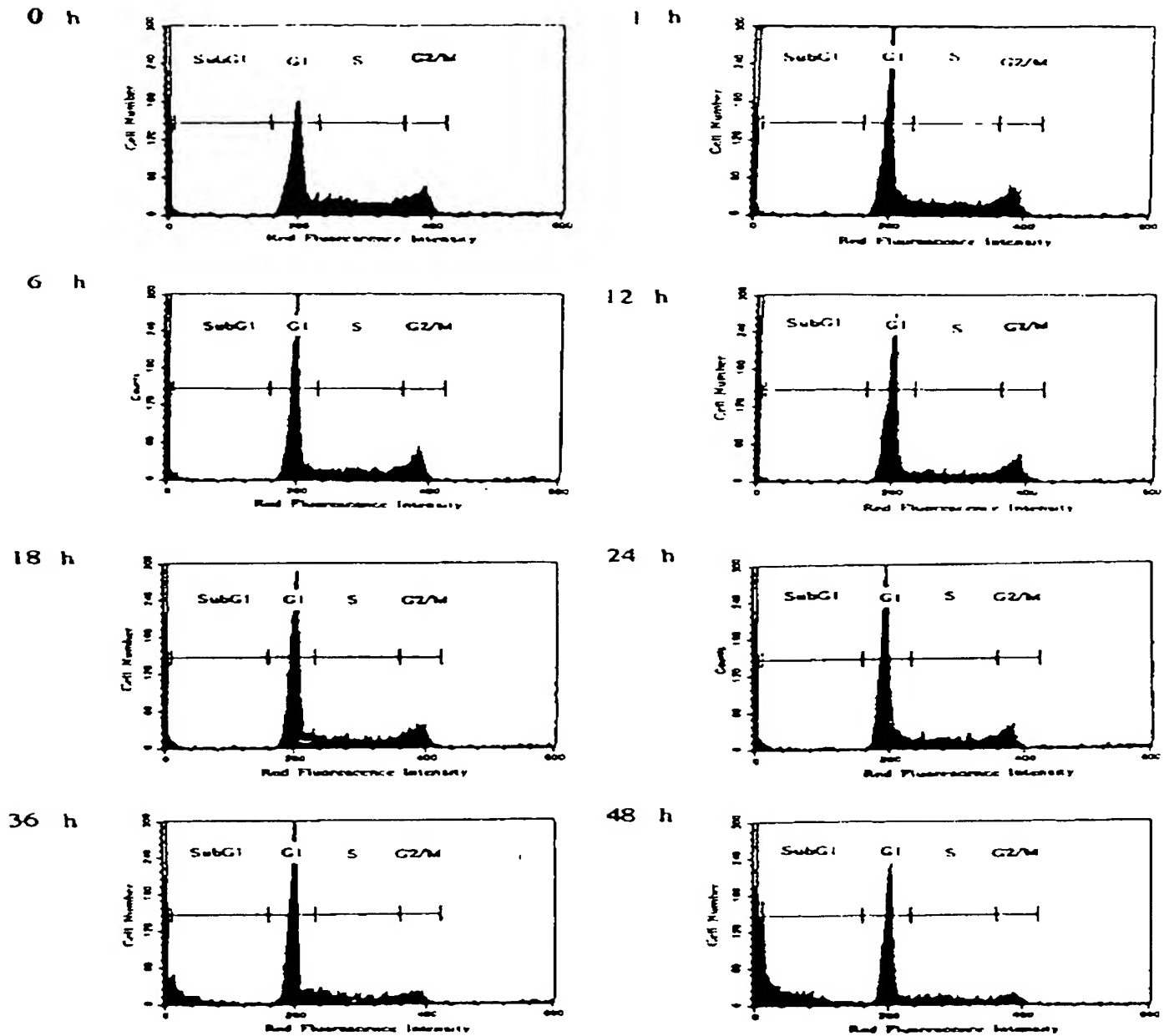
(B)



도면 4

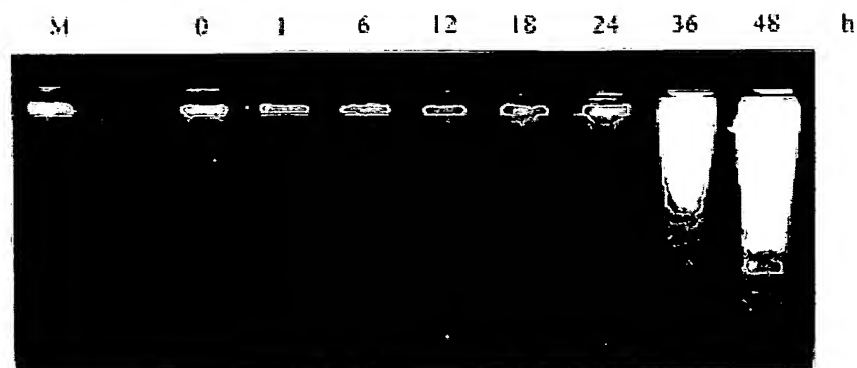


도면 5

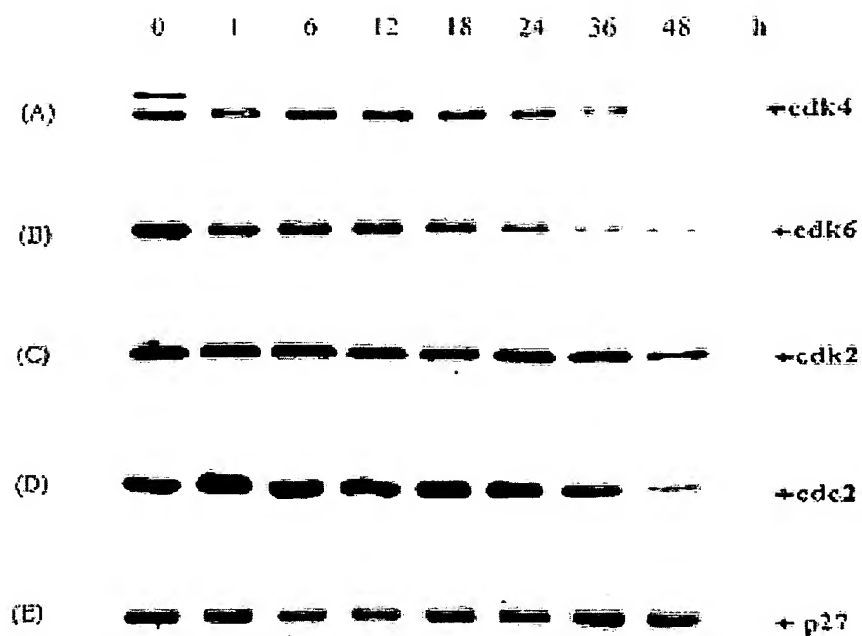


시간(b)	세포주기분석 (%)			
	Sub G <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	2.72	44.12	25.74	13.62
1	2.19	53.13	23.25	12.62
6	2.77	48.18	18.71	12.26
12	2.88	49.66	15.45	11.59
18	2.71	52.96	18.21	12.85
24	4.31	52.8	19.34	8.88
36	13.17	51.16	16.78	6.77
48	33.74	38.94	12.31	4.64

도면 6



도면 7



도면 8

